第40卷 第1期 昆 虫 学 报 Vol. 40, No. 1
1997年2月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Feb., 1997

混合感染后杆状病毒间的增效作用——病毒蛋白及核酸的初步分析*

王 燕 丁 翠 蔡秀玉
(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘要 AsNPV+HasNPV、AsNPV+HaNPV、AsNPV+PsNPV 分别感染烟青虫、棉铃虫和粘虫幼虫，对分离到的核型多角体病毒（AsNPV+HasNPV）-*Helicoverpa assulta*、（AsNPV+HaNPV）-*H. armigera* 和（AsNPV+PsNPV）-*Pseudaletia separata*，经电镜观察，多角体蛋白及病毒粒子蛋白 SDS-PAGE 电泳，病毒核酸的限制性内切酶酶解分析等研究，证明各病毒的多角体形态不规则，大小差异极大，病毒粒子为杆状，（AsNPV+HasNPV）-*H. assulta* 和（AsNPV+HaNPV）-*H. armigera* 病毒粒子有单粒和多粒包埋类型，（AsNPV+PsNPV）-*P. separata* 为多粒包埋型。各病毒的多角体蛋白基本上只有一种多肽，分子量为 25 000 道尔顿左右。（AsNPV+HasNPV）-*H. assulta*、（AsNPV+HaNPV）-*H. armigera* 和（AsNPV+PsNPV）-*P. separata* 的病毒粒子分别有 10、14、5 条多肽，分子量大小在 13 500～98 000，13 000～88 000，18 500～52 000 道尔顿之间。病毒核酸经 *Eco*RI，*Hind*III，*Hind*III+*Bam*HI 酶解，其 DNA 的酶切位点，大小及 DNA 的总分子量与 AsNPV 和原寄主的 HasNPV，HaNPV 和 PsNPV DNA 的酶切图谱存在一定差异，混合病毒侵染昆虫后新复制的病毒核酸发生一定的变化，从而导致病毒蛋白和病毒形态的变化。混合感染后 AsNPV 对 HasNPV、HaNPV 和 PsNPV 的侵染有明显的增效作用，其机理有待深入研究。

关键词 核型多角体病毒，黄地老虎，烟青虫，棉铃虫，粘虫，混合侵染，增效

黄地老虎（*Agrotis segetum* As）、烟青虫（*Helicoverpa assulta* Has）、棉铃虫（*Helicoverpa armigera* Ha）和粘虫（*Pseudaletia separata* Ps）同属鳞翅目夜蛾科昆虫，其分布很广，主要为害棉花，小麦、玉米、辣椒、大豆、烟草等作物，是重要的经济害虫。我们对分离到的 AsNPV、HasNPV、HaNPV 及 PsNPV 的形态，毒力及致病机理等已进行了研究[1~4]，并且发现 AsNPV 对 HasNPV、HaNPV 和 PsNPV 的侵染有明显的增强作用，实验证明：黄地老虎 NPV 可提高棉铃虫 NPV、烟青虫 NPV 和粘虫 NPV 的感染性，与原病毒相比，其幼虫死亡率分别增加 41.7%，28.3%及 19.9%。本文将增效病毒 AsNPV 和几种夜蛾科昆虫的核型多角体病毒混合感染昆虫后，对获得的病毒进行形态观察和病毒蛋白，核酸特性分析，并与 AsNPV 及原宿主 HasNPV，HaNPV 和 PsNPV 的形态，蛋白及核酸特性进行比较，现将初步结果报道如下。

* 国家自然科学基金资助项目
1994-12-23 收稿，1995-03-21 收修改稿

1 材料与方法

1.1 虫种

烟青虫、粘虫采自北京市郊；棉铃虫采自河北保定地区；黄地老虎虫种采自徐州地区。均为室内人工饲料饲养传代的健康幼虫，饲养温度（27±1）℃。

1.2 病毒

AsNPV、HasNPV、HaNPV、PsNPV 均为本实验室分离提供。

从实验室人工饲养的幼虫中挑选虫龄一致的健康个体，用配成一定浓度的病毒悬液感染昆虫，增殖病毒。

收集感染病毒而死的昆虫，将虫尸匀浆，匀浆液用2层纱布过滤去残渣，滤液经差速离心，收集多角体，经蔗糖密度梯度（45%～60% W/V），HITACHI CP-70G 超速冷冻离心机（水平转头）25 000 r/min 4 ℃离心 1 h 进一步纯化、洗涤、干燥后，纯化的病毒多角体干粉－20℃下保存备用。

表1 病毒的增殖

感染病毒	寄主昆虫	分离的病毒
HasNPV	烟青虫	HasNPV
AsNPV+HasNPV (1:1体积混合)	*H. assulta*	(AsNPV+HasNPV)-*H. assulta*
HaNPV	棉铃虫	HaNPV
AsNPV+HaNPV (1:1体积混合)	*H. armigera*	(AsNPV+HaNPV)-*H. armigera*
PsNPV	粘虫	PsNPV
AsNPV+PsNPV (1:1体积混合)	*P. separata*	(AsNPV+PsNPV)-*P. separata*

1.3 病毒形态电镜观察

（1）取纯化的病毒多角体配成适当浓度的悬液，滴于小块玻片上，自然干燥后，喷金，于扫描电镜（S-2360W）观察。

（2）取纯化的病毒多角体配成适当浓度的悬液，滴于 Formvar 膜铜网片上，干燥后碱解一定时间，2%磷钨酸负染，透射电镜（JEM-2000EX）上观察。

1.4 多角体蛋白及病毒粒子蛋白的分离，纯化及 SDS-PAGE 分析

纯化的多角体配成 5 mg/mL 的悬液，于70℃水浴保温 2 h，以灭活可能存在的多角体碱性蛋白酶，用终浓度 0.05 mol/L Na_2CO_3-0.05 mol/L NaCl-0.004 mol/L EDTA (pH10.6) 37 ℃保温 45～60 min（视病毒悬液从灰白变成透明），1N HCl 下调 pH 至 8.5～9.0，终止碱解反应，低速离心（Beckman GS-6KR 台式冷冻离心机，下同），去除未溶解物后，高速离心（Beckman C-MC 高速冷冻离心机 18 000 r/min，40 min），除去病毒粒子，上清对水透析，PEG 6 000 浓缩，冻存。

SDS-PAGE 参照 Laemmli 电泳系统进行不连续垂直板电泳[5]，浓缩胶浓度 4%，

pH 6.8，分离胶浓度 12.5%，pH 8.8。

标准蛋白为 Sigma 公司产品。

标准蛋白混合物加样品溶解液(蛋白终浓度为 0.5 mg/mL)，充分溶解后，95 ℃水浴 4 min，取出冷至室温。

电极缓冲液为 0.1% SDS-Tris-甘氨酸缓冲液，pH8.3，稳压 200 V，电泳时间 4～5 h，考马斯亮兰染色。

1.5　病毒 DNA 的分离纯化及限制性内切酶分析

用 SDS-苯酚法提取核酸如下：

取纯化的病毒多角体，用碱解液配成 5 mg/mL 悬液，37 ℃水解至悬液从灰白变成透明，用 1N HCl 将 pH 调至 8.0 左右，5 000 r/mim 离心 10 min，上清液加 5% SDS 至终浓度 0.5%，37 ℃水浴 1 h，4 ℃过液；加入等体积的饱和酚 (pH8.0)，室温下振荡 2 h，5 000 r/min离心 10 min，小心吸取上层水相，再加入等体积酚，振荡，离心，如此反复抽提 2～3 次，除净蛋白质；水相中加入等体积冷乙醚，除酚，振荡 10 min，5 000 r/min 离心 10 min，取下层水相；在水相中加入 2 倍体积的无水乙醇，随着乙醇的加入，可见溶液中出现白色丝状粘稠物质，－20℃过液；用玻棒缠起丝状物，用 70%、80%、95%、100% 冷乙醇漂洗沉淀的 DNA，FTS 真空干燥仪干燥 DNA，或溶于 TE buffer，－20℃保存。

*Eco*RI，*Hin*dIII，*Hin*dIII＋*Bam*HI 及相应酶解缓冲液购自华美生物工程公司。NPV-DNA 37 ℃保温 1～2 h。酶解片段在 0.7%琼脂糖板凝胶作电泳分离，采用 TBE 电极缓冲液，溴乙锭 (EB) 在溶胶时直接加入胶中 (终浓度为 0.5 μg/mL)，电泳时间 6～7 h，电泳毕，紫外检测仪下观察电泳结果，拍照。

2　结果

2.1　多角体和病毒粒子的形态观察

2.1.1　AsNPV：多角体大多呈六边形，平均大小为 1.5 μm，大小比较均一，表面不太光滑，可见凹窝和突起，病毒粒子为均一短杆状，多粒包埋 (图版 Ⅰ：1，2)。

2.1.2　感染烟青虫后分离的病毒：HasNPV 多角体平面观大多呈五边形，大小较均一，平均为 1.3 μm；多角体中的病毒粒子随机分布，为均一杆状，单粒包埋型病毒 (图版 Ⅰ：3，4)。(AsNPV＋HasNPV) -*H. assulta* 多角体表面呈不规则多边形，大小差异极大，大小范围在 0.9～2.6 μm；病毒粒子杆状，有单粒包埋和多粒包埋类型 (图版 Ⅰ：5，6)。

2.1.3　感染棉铃虫后分离的病毒：HaNPV 多角体表明多有突起，较钝圆，大小较均一，平均为 1.1 μm；病毒粒子杆状，为单粒包埋类型 (图版 Ⅰ：7，8)。 (AsNPV＋HaNPV) -*H. armigera* 多角体钝圆，大小有差异 (图版 Ⅰ：9)；病毒粒子杆状，单粒包埋和多粒包埋类型同时存在 (图版 Ⅰ：10)。

2.1.4　感染粘虫后分离的病毒：PsNPV 多角体表面不光滑，多有突起和多角体嵌合现象，为非规则多面体，平均大小为 1.5 μm；病毒粒子为均一短杆状，多粒包埋类型 (图版 Ⅰ：11，12)。(AsNPV＋PsNPV) -*P. separata* 多角体有嵌合现象，表面多有突起，平

均大小1.4 μm；病毒粒子呈短杆状，大小有差异，均为多粒包埋类型(图版 I ：13，14)。

2.2 病毒蛋白的部分特性

各病毒多角体蛋白及病毒粒子蛋白经SDS-PAGE，用考马斯亮兰R-250染色，结果如图1、图2、图3。电泳结果显示，分离的各病毒多角体蛋白含量极高，大小相差不大，分子量大小在25 000道尔顿左右。但病毒粒子蛋白较复杂。结果表明。(AsNPV+HasNPV) -*H. assulta* 的粒子多肽与AsNPV及HasNPV的粒子多肽不完全相同，有一些谱带缺失；而(AsNPV+HaNPV) -*H. armigera* 的谱带于HaNPV和AsNPV的谱带不同，有其特有的谱带。(AsNPV+PsNPV)-*P. separata* 的粒子蛋白的谱带与PsNPV的谱带相似，且与AsNPV的谱带也相似。

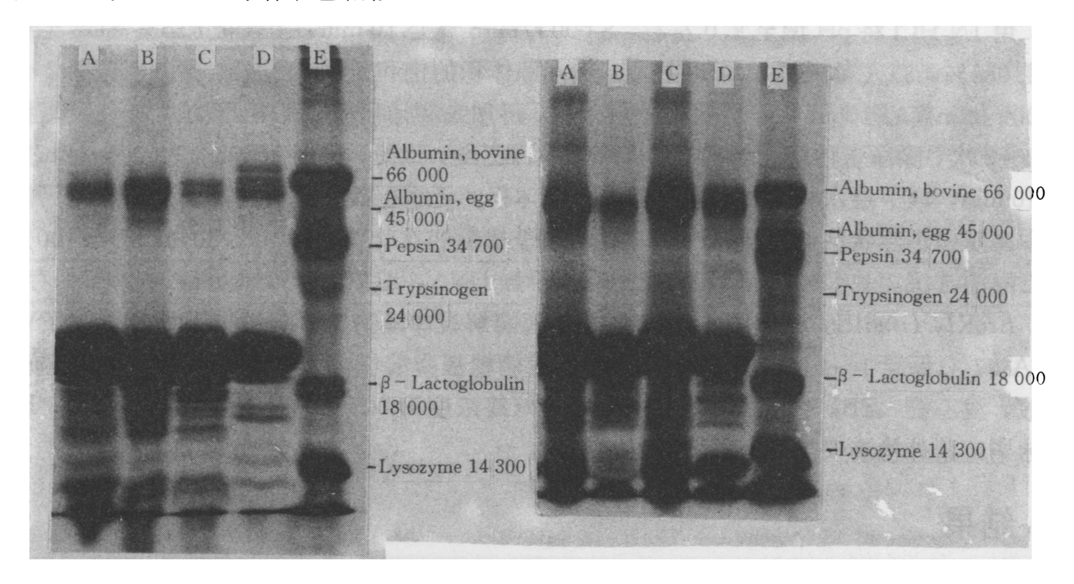


图1 多角体蛋白及病毒粒子蛋白SDS-PAGE图谱

A. (AsNPV+HasNPV) -*H. assulta*； B. AsNPV； C. AsNPV-*H. assulta*； D. HasNPV； E. standard proteins

图2 多角体蛋白及病毒粒子蛋白SDS-PAGE图谱

A. AsNPV-*H. armigera*； B. AsNPV； C. (AsNPV+HaNPV) -*H. armigera*； D. HaNPV； E. standard proteins

2.3 病毒核酸的部分特性

2.3.1 HasNPV，(AsNPV+HasNPV) -*H. assulta*，其DNA的*Eco*RI，*Hin*dIII，*Hin*dIII+*Bam*HI酶切片段，经0.7%琼脂糖凝胶电泳，结果如图4，图5，图6所示。图中表明，HasNPV DNA-*Eco*RI片段为21，*Hin*dIII 18，*Hind*+*Bam*HI 25；(AsNPV+HasNPV) -*H. assulta* DNA-*Eco*RI片段为15，*Hin*dIII 8，*Hin*dIII+*Bam*HI 15。以λDNA-*Eco*RI和λDNA-*Hin*dIII片段作分子量标准，取其对数对其泳动度作标准曲线，从标准曲线上测出NPV-DNA各限制性片段分子量。NPV-DNA分子量用片段分子量总和法计算，其结果为HasNPV DNA-*Eco*RI 85.65，*Hin*dIII 78.56，*Hin*dIII+*Bam*HI 74.41×10^{6}道尔顿，三种

酶所得之值作平均为 79.54×10^6 道尔顿；(AsNPV+HasNPV)-*H. assulta*DNA-*Eco*RI 61.52，*Hin*dIII 66.10，*Hin*dIII + *Bam*HI 59.37×10^6 道尔顿，平均 62.33×10^6 道尔顿，从电泳结果看出，(AsNPV+HasNPV)-*H. assulta* DNA 的 *Eco*RI，*Hin*dIII，*Hin*dIII + *Bam*HI 的酶切片段与 AsNPV DNA 和 HasNPV DNA 的酶切片段都不完全相同，有各自不同的酶切位点，形成不相同的酶切谱带。

2.3.2　HaNPV，(AsNPV+HaNPV)-*H. armigera*，其 DNA 的 *Eco*RI，*Hin*dIII，*Hin*dIII +*Bam*HI 酶切片段的琼脂糖凝胶电泳结果如图 4，图 5，图 6 所示。HaNPV DNA-*Eco*RI 片段为 18，*Hin*dIII 17，*Hin*dIII+*Bam*HI 22；(AsNPV + HaNPV)-*H. armigera* DNA-

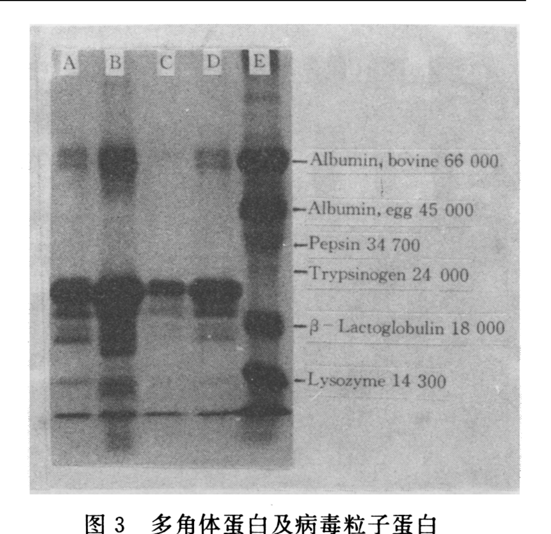


图 3　多角体蛋白及病毒粒子蛋白 SDS-PAGE 图谱

A. AsNPV-*separata*；　B. AsNPV；C. (AsNPV +PsNPV)-*P. separata*；　D. PsNPV；E. standard proteins.

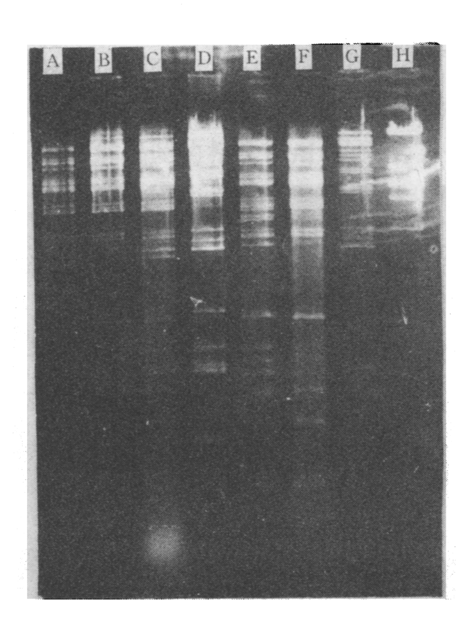


图 4　DNA-*Eco*RI 酶切片段琼脂糖电泳图谱

A. (AsNPV+HasNPV)-*H. assulta* DNA；　B. (AsNPV+HaNPV)-*H. armigera* DNA；C. AsNPV-*H. assulta* DNA；　D. AsNPV-*H. armigera* DNA；E. HasNPV DNA；F. HaNPV DNA；G. AsNPV DNA；　H. λDNA

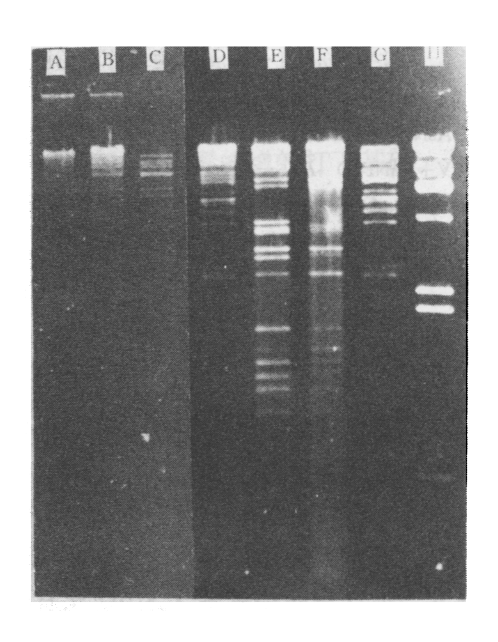


图 5　DNA-*Hin*dIII 酶切片段琼脂糖电泳图谱

A. (AsNPV+HasNPV)-*H. assulta* DNA；　B. (AsNPV+HaNPV)-*H. armigera* DNA；　C. AsNPV-*H. assulta* DNA；　D. AsNPV-*H. armigera* DNA；E. HasNPV DNA；F. HaNPV DNA；　G. AsNPV DNA；H. λDNA

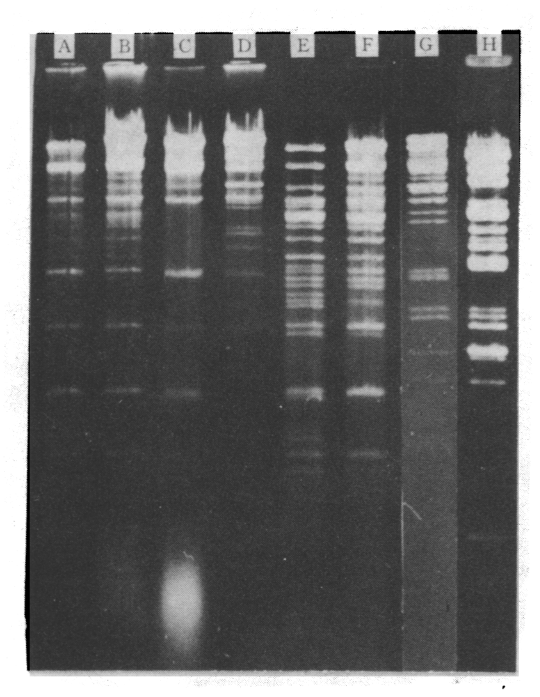


图 6　DNA-*Hin*dIII+*Bam*HI 酶切片段琼脂糖电泳图谱

A.（AsNPV+HasNPV）-*H. assulta* DNA；　B.（AsNPV+HaNPV）-*H. armigera* DNA；　C. AsNPV-*H. assulta* DNA；　D. AsNPV-*H. armigera* DNA；E. HasNPV DNA；　F. HaNPV DNA；G. AsNPV DNA；　H. λDNA

*Eco*RI 19，*Hin*dIII 13，*Hin*dIII+*Bam*HI 24。从电泳结果看，（AsNPV+HaNPV）-*H. armigera* DNA 的酶切片段很相似，与 AsNPV DNA 和 HaNPV DNA 的酶切片段不完全相同，但与 AsNPV DNA 片段的相似性要大于与 HaNPV DNA 片段的相似性，说明它们的 DNA 限制性内切酶片段与 AsNPV 片段更相近。

2.3.3　PsNPV，（AsNPV + PsNPV）-*P. separata*，其 DNA 的 *Eco*RI 酶切片段的琼脂糖凝胶电泳结果如图 7 所示。PsNPV DNA 的 *Eco*RI 酶切片段数为 21，大小在 81.09×10^6 道尔顿；（AsNPV+PsNPV）-*P. separata* DNA-*Eco*RI 片段为 21，大小为 106.69×10^6 道尔顿。（AsNPV+PsNPV）-*P. Separata* DAN 的 *Eco*RI 酶切片段电泳图谱与 PsNPV DNA 的酶切片段相近，与 AsNPV DNA 的酶切片段有所不同。

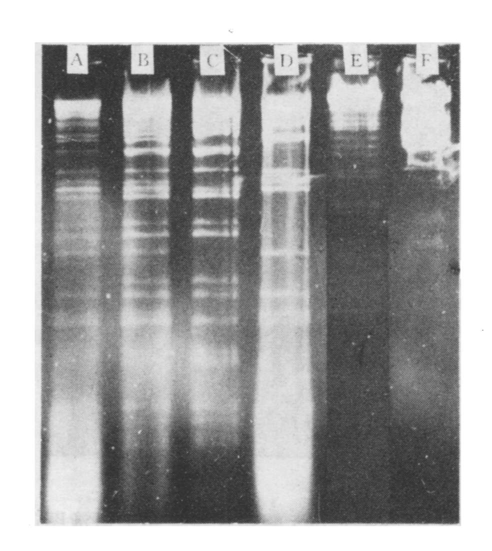


图 7　DNA-*Eco*RI 酶切片段琼脂糖电泳图谱

A.（AsNPV+PsNPV）-*P. separata* DNA；B. Ps^H NPV DNA；　C. Ps^B NPV DNA；D. PsNPV-*P. separata* DNA；　E. AsNPV DNA；F. λDNA

3　分析与讨论

3.1　病毒的形态特征

混合病毒感染烟青虫，棉铃虫和粘虫后分离的病毒多角体形态不规则，大小差异变化很大，说明并不是两种病毒多角体的数量上混合。但分离的病毒是 AsNPV 还是原宿主病毒，或是发生了别的变异，单纯电镜观察的结果难以分辨，需进一步用免疫技术加以鉴别。HuKuhara *et al*.（1987）[6]在美洲粘虫 PuGV 对 NPV 侵染增效的研究试验中发现，同样浓度的 PuGV 和斜纹夜蛾 NPV 混合后感染斜纹夜蛾，昆虫并不被 GV 所侵染，使昆虫染病的是 NPV，GV 的作用是提高了 NPV

的侵染力。混合病毒感染烟青虫，棉铃虫和粘虫后，在昆虫体内新复制的病毒主要还是 HasNPV，HaNPV 和 PsNPV，AsNPV 可能主要起提高这些病毒感染力的作用。但病毒的形态是由病毒基因组控制的，并且在表现过程中，受环境因素的影响也较大，所以并不能以病毒形态作为唯一的标准。

3.2　病毒蛋白和核酸的部分特性

混合病毒感染棉铃虫后分离的病毒，其病毒粒子多肽的 SDS-PAGE 以及 DNA 的限制性内切酶酶解片段分析，图谱与 AsNPV 的多肽与 DNA 片段相似[7]；而混合病毒感染烟青虫后的病毒则与 AsNPV，HasNPV 都不完全相同；混合病毒感染粘虫后提纯的病毒则与粘虫 PsNPV 的相似，可能与 AsNPV 和 PsNPV 同为多粒包埋型病毒有关。蛋白和核酸的分析结果与增效强度有一定关系，即 AsNPV 对 HaNPV 的增效作用最强，对 HasNPV 次之，对 PsNPV 的增效作用低于对 HaNPV 和 HasNPV 的增效。

一种昆虫同时被两种不同病毒所感染的现象是很普遍的。Harper[8]认为多种病毒对昆虫的作用主要有累加作用、增强作用和拮抗作用。但病毒混合感染昆虫后，在昆虫体内发生的变化，了解还很少。病毒间增效作用的研究不但具有重要的理论意义，更由于其在害虫防治上的广阔前景，而日益受到重视。目前，国内对昆虫病毒间的增效作用尚未见有报道，而国外的研究主要集中在增效蛋白的分离，鉴定以及增效蛋白基因的定位与克隆，对增效机理的研究集中在增效因子对昆虫的作用等方面[9~10]。本试验从混合病毒侵染昆虫后，在虫体内新复制的病毒的遗传物质基础 DNA 以及蛋白质和病毒形态的变化角度研究混合病毒间的相互作用，从而为在分子水平上研究昆虫病毒的增效打下基础。

AsNPV 对 HasNPV，HaNPV 和 PsNPV 的增强机理等都有待于进一步深入的研究。

参　考　文　献

1　蔡秀玉，丁翠. 在我国发现的一些昆虫病毒，昆虫学报，1982，**25**（4）：413～415

2　蔡秀玉，丁翠. 棉铃虫核型多角体病毒新毒株的分离及其毒力的研究. 动物学集刊，1986，**4**：31～36

3　翁启勇，蔡秀玉，邓　塔. 黄地老虎核型多角体病毒的一些特性. 昆虫学报，1992，**35**（1）：53～57

4　邓塔，蔡秀玉，烟青虫核型多角体病毒的复制和染病后血淋巴蛋白的变化. 昆虫学报，1993，**36**（4）：423～429

5　Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature，1970，**227**：680～685

6　Hukuhara T *et al*. Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infection. Appl. Entomol. Zool，1987，**22**（27）：235～236

7　Allaway G P. A biochemical and biological comparison of three European isolates of nucleear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*. Arch. Virol. 1983，**75**：43～54

8　Harper J D. Interactions between baculoviruses and other entomopathogens，chemical pesticides and parasitoids. In：The Biology of Baculoviruses. Vol. 2，first ed. Boca Raton，FL：CRC press，1986，133～155

9　Hashimoto Y *et al*. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. J. Gen. Virol. 1991，**72**（72）：265～2651

10　Zhu Y *et al*. Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm，*Pseudaletia nuipuncta*. J. Invertebr. Pathlo. 1989，**54**：49～56

THE SYNERGISTIC ACTION BETWEEN BACULOVIRUSES AFTER MIXED INFECTION ——A PRIMARY ANALYSIS OF VIRAL PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS

Wang Yan Ding Cui Cai Xiuyu
(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing* 100080)

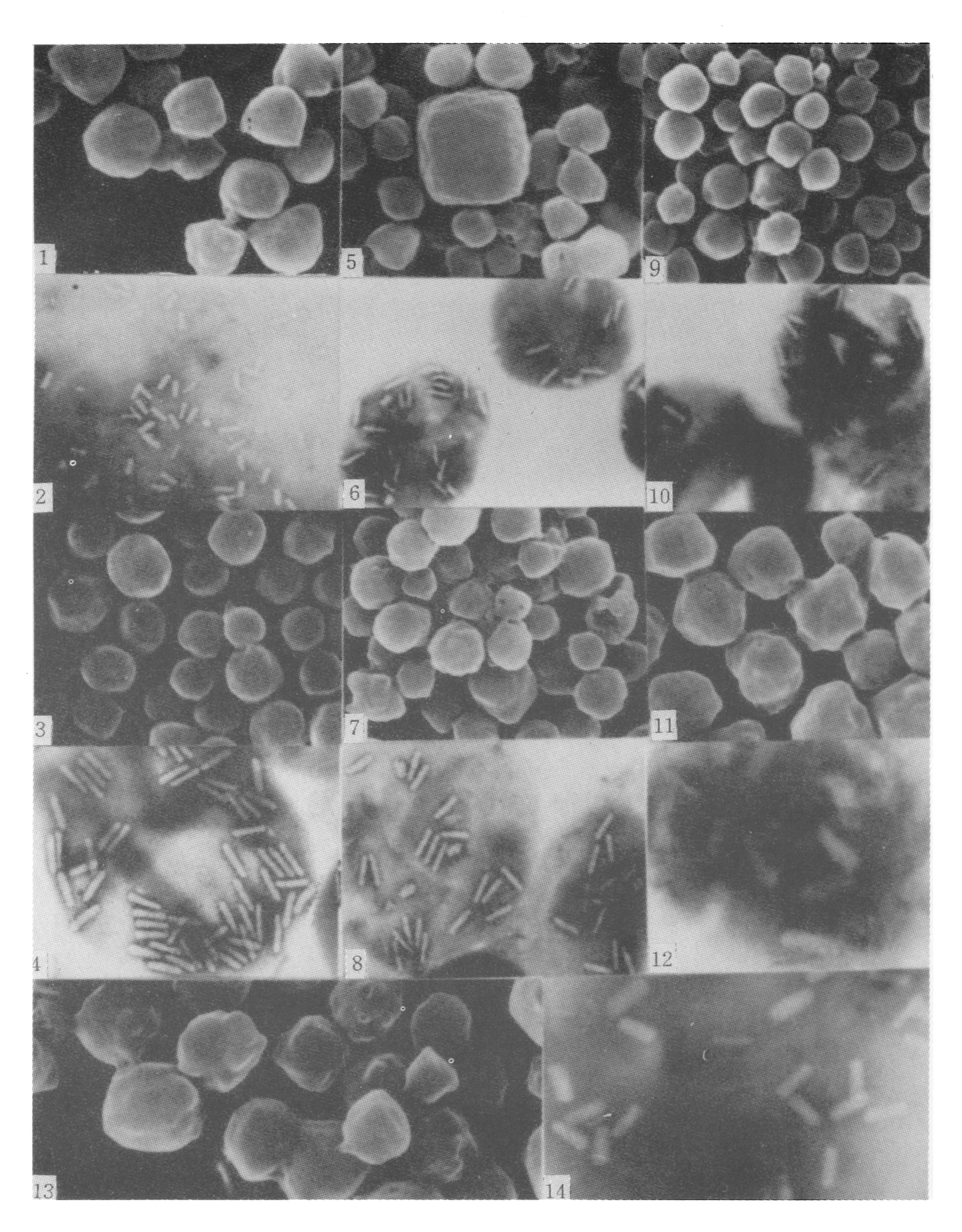
Abstract AsNPV was mixed with HasNPV, HaNPV and PsNPV separately and the three mixtures were used to infect the larvae of *Helicoverpa assulta*, *H. armigera* and *Pseudaletia separata* respectively. The nuclear polyhedrosis viruses thus obtained were called (AsNPV+HasNPV) -*H. assulta*, (AsNPV+HaNPV) -*H. armigera* and (AsNPV+PsNPV) -*P. separata* respectively. The polyhedra of the NPVs were in irregular shape and varied distinctly in sizes. The biochemical charcaters of the viruses were investigated and compared with those of HasNPV, HaNPV and PsNPV. The polyhedrin and viral structural polypeptides of the NPVs were examined by using SDS-PAGE. The polyhedrin of all NPVs had molecular weight of about 25 000 dalton. The numbers of the viral structural polypeptides of (AsNPV+HasNPV)-*H. assulta*, (AsNPV+HaNPV)-*H. armigera* and (AsNPV+PsNPV) -*P. separata* were 10, 14, 5 respectively, and their molecular weights were 13 500～98 000, 13 000～88 000, 18 500～52 000 dalton. The analysis of agarose electrophoretic profiles of DNAs restriction endonuclease fragments showed that they were not identical to those of AsNPV, HasNPV, HaNPV and PsNPV. The DNAs of the viruses had changed and resulted in the changes of viral proteins and viral morphogenesis. *Agrotis segetum* nuclear polyhedrosis virus (AsNPV) can enhance the infection of HasNPV, HaNPV and PsNPV. The enhancement mechanism of AsNPV is worthwhile to be further investigated.

Key words nuclear polyhedrosis virus (NPV), *Agrotis segetum*, *Helicoverpa assulta*, *Helicoverpa armigera*, *Pseudaletia separata*, mixed infection, enhancement

图 版 说 明

图版 I

1. AsNPV 的多角体，×8 000；2. AsNPV 的病毒粒子；3. HasNPV 的多角体，×8 000；4. HasNPV 的病毒粒子；5. (AsNPV+HasNPV) -*H. assulta* 的多角体，×8 000；6. (AsNPV+HasNPV) -*H. assulta* 的病毒粒子；7. HaNPV 的多角体，×8 000；8. HaNPV 的病毒粒子；9. (AsNPV+HaNPV) -*H. armigera* 的多角体，×8 000；10. (AsNPV+HaNPV) -*H. armigera* 的病毒粒子；11. PsNPV 的多角体，×10 000；12. PsNPV 的病毒粒子；13. (AsNPV+PsNPV) -*P. separata* 的多角体，×10 000；14. (AsNPV+PsNPV) -*P. separata* 的病毒粒子


1
5
9
2
6
10
3
7
11
4
8
12
13
14